

論文内容の要旨

論文提出者氏名 清水輝記

論文題目

Low Dose Gemcitabine Increases the Cytotoxicity of Human V γ 9V δ 2 T Cells in Bladder Cancer Cells *in vitro* and in an Orthotopic Xenograft Model

論文内容の要旨

主に自然免疫を司る $\gamma\delta$ T細胞は、MHC非拘束性に様々な癌種に対して抗腫瘍効果を発揮することが知られている。ゾレドロン酸 (Zoledronic acid: ZOL) と IL2 の刺激により末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cell: PBMC) から体外大量増幅することが可能で、 $\gamma\delta$ T細胞の亜分画である V γ 9V δ 2 T細胞が特異的に増幅される。また $\gamma\delta$ T細胞は TCR $\gamma\delta$ を介して、メバロン酸代謝経路の中間代謝産物であるイソペンテルピロリン酸 (Isopentenyl pyrophosphate: IPP) を認識し抗腫瘍効果を発揮するが、癌細胞に対しての ZOL 前処置は、癌細胞内に IPP を蓄積させ $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍効果を増強させる。このことを利用し、 $\gamma\delta$ T細胞免疫療法の臨床試験が行われている。しかし今までの全身投与による臨床試験では、細胞免疫療法の安全性は確認されているが、治療の有効性は未だ満足のものはない。そこで本研究では、 $\gamma\delta$ T細胞の効果を最大限に発揮するために未だ臨床試験が行われていない $\gamma\delta$ T細胞膀胱内注入療法に着目した。膀胱癌に対する膀胱内注入療法の標準的治療として BCG 膀胱内注入療法が現在中心的な役割を果たしているが、BCG 抵抗性難治性膀胱癌が少なからず存在する。そのような症例には膀胱全摘術が施行され、患者の QOL 低下がもたらされる。そこで、BCG 抵抗性難治性膀胱癌に対する代替治療開発を目指して、 $\gamma\delta$ T細胞膀胱内注入療法の効果を検討することを目的に以下の研究を行った。

健康人ボランティア末梢血 20 ml から採取 (倫理委員会承認番号 ERB-C-862) した PBMC に ZOL と IL2 を添加し、11 日間適切な条件下で体外増幅培養を行い、 $\gamma\delta$ T細胞への分化誘導効率をフローサイトメトリー法で解析した。CD3/TCR $\alpha\beta$ /TCR $\gamma\delta$ の 3 重染色を行い、CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺を $\gamma\delta$ T細胞の分画と定義して調べたところ、培養前では CD3 陽性 T 細胞中 2%程度であった $\gamma\delta$ T細胞は、11 日間の培養後には 80%以上となり、細胞総数も約 1600 倍まで大量増幅され

た。この $\gamma\delta$ T細胞を以下の実験でのエフェクター細胞として使用した。

ヒト膀胱癌株として、UMUC3,T24,TCCSUP 細胞を使用した。膀胱癌株と $\gamma\delta$ T細胞の 4 時間共培養を行い、癌細胞のアポトーシスをフローサイトメトリー法により解析したところ、癌細胞のアポトーシス細胞数は、3 種類の細胞株全てにおいて癌細胞への ZOL 前処置、および Effector/Target 比 (E/T 比) 依存的に増加した。なお、正常膀胱上皮細胞株 HBEC-A に対しては、 $\gamma\delta$ T細胞によるアポトーシスの増強はほとんど認められなかった。さらに共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、 $\gamma\delta$ T細胞が癌細胞を取り囲むように群がり癌細胞を破壊している様子が観察された。これらの実験結果から、*in vitro* の実験系において $\gamma\delta$ T細胞が膀胱癌細胞に強力な抗腫瘍効果を発揮することが確認された。

次に、 $\gamma\delta$ T細胞の感受性を高めるべく、抗がん剤を併用した免疫複合療法の可能性を検証するため、標準治療薬であるゲムシタビン (gemcitabine: GEM) やシスプラチン、その他数種類の抗癌剤併用による抗腫瘍効果を検討した。WST-8 アッセイにて抗癌剤自体では殺細胞効果をもたらさない薬剤処置濃度、曝露時間を決定後、抗癌剤を ZOL と同時に癌細胞へ前処置しフローサイトメトリー法にて検討した。 $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍効果は GEM (5 μ M、24 時間処置) を併用により有意に増強された。

GEM の抗腫瘍効果増強の機序を明らかにするため、 $\gamma\delta$ T細胞に発現する NKG2D の ligand である MHC class1 chain-related proteins A/B (MICA/B) に着目し検討した。GEM 処置により MICA/B の発現が増強され、さらに RNA 干渉法を用いて MICA/B をノックダウンしたところ、GEM にて増強された $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍効果は消失した。このことより、GEM は MICA/B の発現を増加させ $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍効果を増強することが明らかとなった。

最後に *in vivo* での $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍効果を評価するために、正所性膀胱癌モデルマウスを作製した。Luciferase 遺伝子を導入した癌細胞の生体発光を In Vivo Imaging System (IVIS) で評価できる実験系を確立した。第 0 日に 1×10^6 個の UMUC3-luc 細胞を経尿道的に膀胱内に移植した。第 7 日に IVIS で生体発光を認めた担がんモデルマウスに対して、 1×10^7 個の $\gamma\delta$ T細胞と ZOL (5 μ M) を同時に経尿道的に投与し治療を行った (第 7 日、第 14 日、第 21 日、第 28 日)。治療群のマウスでは無治療群のマウスと比較して、生体発光の著明な減弱を認めた。次に GEM の経腹膜的前処置を 4 回 (第 6 日、第 13 日、第 20 日、第 27 日) を追加したところ、GEM 処置無し群と比較して GEM 処置群では $\gamma\delta$ T細胞治療効果が統計学的に有意に増強した。

本研究の結果から、 $\gamma\delta$ T細胞膀胱内注入療法は強力な抗腫瘍効果を発揮し、さらに GEM は $\gamma\delta$ T細胞の感受性を増強させることが示唆された。膀胱内 $\gamma\delta$ T細胞注入療法は輸注療法に比較して、癌組織へのエフェクター細胞の直接の接触が可能な理想的な投与方法であり、今後、臨床応用に向けた展開が期待できる。